

# Wątrobowa aktywność wydzielnicza greliny u chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby

Hepatic secretory activity of ghrelin in patients with chronic viral hepatitis

Andrzej Cieśla<sup>1</sup>, Tomasz Mach<sup>1</sup>, Krystyna Pierzchała-Koziec<sup>2</sup>, Joanna Zubel<sup>2</sup>, Paweł Skwara<sup>1</sup>, Michał Jędrychowski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Gastroenterologii, Hepatologii i Chorób Zakaźnych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

<sup>2</sup>Wydział Fizjologii Zwierząt Akademii Rolniczej w Krakowie

Przegląd Gastroenterologiczny 2007; 2 (2): 106–110

**Słowa kluczowe:** grelina, wirusowe zapalenie wątroby, błona śluzowa żołądka.

**Key words:** ghrelin, hepatitis, gastric mucosa.

**Adres do korespondencji:** dr n. med. Andrzej Cieśla, Klinika Gastrologii i Hepatologii oraz Klinika Chorób Zakaźnych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, ul. Śniadeckich 5, 31-531 Kraków, faks +48 12 424 73 80, e-mail: aciesla@su.krakow.pl

## Streszczenie

Grelina jest neuropeptydem włączonym w regulację bilansu energetycznego organizmu. Znaczenie wątroby w przemianach greliny pozostaje przedmiotem badań. Dotychczasowe wyniki ograniczają się do obserwacji zaburzeń osoczowego poziomu tego hormonu spowodowanego różnymi formami uszkodzenia narządu.

**Cel pracy:** Celem pracy była ocena metabolizmu greliny w wątrobie. Realizacja zamierzenia opierała się na ocenie stężenia oraz wydzielania podstawowego i stymulowanego greliny w tkankach wątroby i żołądka. Porównanie przemian greliny w obu narządach wynika z dokładniejszego zdefiniowania roli pełnionej przez badany związek w żołądku, będącego głównym źródłem hormonu w tkankach obwodowych.

**Materiał i metody:** Badaniem objęto 11 chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby, u których wykonano biopsję wątroby oraz gastroscopię ze wskazań klinicznych. Źródłem materiału była biopsja gruboigłowa wątroby oraz wycinek błony śluzowej żołądka w gastroscopii. Metodą radioimmunologiczną określono zawartość greliny w biopsacie wątroby i żołądka. Pomiar stopnia wydzielania badanego związku przeprowadzono w warunkach stabilizacji wydzielania oraz w następstwie stymulacji przez dodatek naltreksonu i greliny.

**Wyniki:** Stężenie greliny śluzówki żołądka było 20-krotnie wyższe niż mięszu wątroby ( $p < 0,001$ ). Wydzielanie podstawowe oraz stymulowane nie wykazały różnicowania w materiale tkankowym wątroby i żołądka.

**Wnioski:** Wyniki badania potwierdziły obecność greliny i aktywność wydzielniczą mięszu wątroby. Tkanka wątrobowa wykazała kilkunastokrotnie niższe stężenia oznaczanego związku w stosunku do ilości zawartej w śluzówce żołądka. W warunkach podstawowych oraz w następstwie stymulacji naltreksonem i greliną tkanka wątrobową i żołądkową wykazały zbliżone wydzielanie.

## Abstract

Ghrelin is a neuropeptide which takes part in the regulation of energetic balance in the human body. The role of the liver in ghrelin metabolism remains unclear. Previous studies were based on observations of changes in ghrelin concentrations in serum in different liver diseases. It is well known that the gastric mucosa seems to be the main source of ghrelin in the peripheral tissues.

**The aim of the study** was to evaluate ghrelin metabolism in the liver. It was based on the assessment of ghrelin concentration, basic and peak stimulated secretion by liver and gastric mucosa.

**Material and methods:** The study was performed on 11 patients with chronic viral hepatitis who were examined by liver biopsy and gastroscopy because of clinical indications. Liver samples taken by Menghini thick needle method and biopsates of gastric mucosa were examined. The concentration of ghrelin was measured by radioimmunological method, accounted by 1 mg protein tissue. Ghrelin secretion was studied in two different conditions: stabilized and stimulated by naltrexone and ghrelin.

**Results:** The concentration of ghrelin in the gastric mucosa was twenty times higher than in the liver tissues ( $p < 0,001$ ). There were no significant differences between the liver and stomach tissues in both basic and stimulated ghrelin secretion.

**Conclusions:** The concentration of ghrelin in the liver is lower than in the gastric mucosa. In the stabilized and stimulated by ghrelin and naltrexone conditions the levels of ghrelin in the liver and stomach were similar.

## Wstęp

Grelina jest 28-aminokwasowym peptydem będącym ligandem sekrecyjnego receptora hormonu wzrostu (GHS-R). Głównym miejscem syntezy greliny są komórki neuroendokrynne dna i trzonu żołądka [1, 2], a miejscem degradacji – nerki, wątroba i żółć [3, 4].

Dotychczasowe dane literaturowe, przedstawiające zmiany poziomu greliny w schorzeniach wątroby, dotyczą opisu zwiększonego stężenia tego hormonu w osoczu w niewyrównanej marskości wątroby [4]. W pierwotnej marskości żółciowej wątroby zwiększa się stężenie leptyny – odpowiadającej za stymulację prozapalnych cytokin i katabolizm – a obniża się stężenie greliny [5].

Grelina uczestniczy wraz z insuliną, leptyną, adiponektyną oraz rezystyną w regulacji bilansu energetycznego organizmu. Ośrodkowe oddziaływanie w zakresie podwzgórza jest przeciwstawne do leptyny i prowadzi do zwiększonego przyjmowania pokarmów [6]. Marchesini i wsp. [7] obserwowali wzrost poziomu greliny u pacjentów z uszkodzeniem wątroby, który tłumaczyli kompensacyjnym mechanizmem zapobiegającym pogłębianiu ujemnego bilansu energetycznego. W pierwotnym raku wątroby [4] obniżony poziom greliny jest odwrotnie skojarzony z poziomem alfa fetoproteiny i interpretowany jako przyczyna zespołu anoreksyjno-kachektycznego.

Zmiany w zakresie tkanki tłuszczowej występujące pod wpływem greliny nie wynikają tylko ze zwiększenia podaży energetycznej wywołanej zmianą zachowań, ale dotyczą także jej bezpośredniego oddziaływania na gospodarowanie zasobami energetycznymi tkanki tłuszczowej, mięśni i wątroby [7–9]. W niealkoholowym stłuszczeniu wątroby postulowany jest związek obniżenia poziomu osoczowej greliny z występującą w tym schorzeniu insulinoopornością [10].

Grelina to hormon szeroko rozpowszechniony w organizmie. Ekspresję mRNA tego peptydu stwierdza się w większości tkanek, w tym także w wątrobie [11]. Tak szerokie rozpowszechnienie tego związku nie znalazło wytłumaczenia w dotychczasowych publikacjach i pozostaje przedmiotem dalszych badań. Podtyp 1a GHS-R ma największą ekspresję w przednim płacie przysadki (ten rodzaj receptora nie jest stwierdzany w miększu wątroby). Podtyp 1b GHS-R występuje w większości tkanek, w tym także w wątrobie, ale jego funkcja nie jest znana. Przyjmuje się możliwość istnienia większej liczby podtypów receptorów GHS-R [11].

Podsumowując wyniki dotychczasowych prac, należy stwierdzić, że odnoszą się one do oceny poziomu greliny w osoczu krwi, potwierdzając jej związek z zaburzeniami funkcji i metabolizmu wątroby, dokumentując także syntezę badanego związku wraz z obecnością niektórych podtypów receptora sekrecyjnego hormonu wzrostu w obrębie miększu wątroby.

## Cel pracy

Celem pracy była ocena metabolizmu greliny w wątrobie. Realizacja zamierzenia opierała się na określeniu stężenia oraz wydzielania podstawowego i stymulowanego greliny w tkankach wątroby i żołądka. Porównanie przemian hormonu w obu narządach wynika z dokładniejszego zdefiniowania roli żołądka w metabolizmie greliny, będącego jej głównym źródłem w tkankach obwodowych.

## Materiał i metody

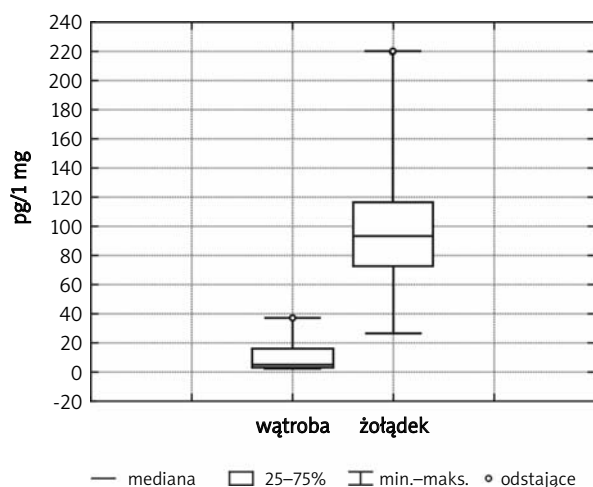
Badaniem objęto 11 chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu B i C, w wieku od 20 do 56 lat, u których wykonano biopsję wątroby wg Menghiniego oraz gastroskopię ze wskazań klinicznych.

Źródłem materiału tkankowego do badań były wycinki wątroby oraz błony śluzowej dna i trzonu żołądka. Do oznaczania stężeń tkankowych badane próbki zamrażano w temperaturze  $-75^{\circ}\text{C}$  i przechowywano do czasu dalszej analizy. Wycinki ważono i homogenizowano w buforze fosforanowym o pH 7,1, a następnie wirowano z prędkością 4000 obrotów/min przez 5 min i oddzielano nadsącz, w którym oznaczano poziom greliny.

Wydzielanie *in vitro* greliny z tkanek przeprowadzono wg metody Kowalskiego i Girauda [12]. Bezpośrednio po pobraniu wycinki ważono i cięto przy użyciu mikrotomu na skrawki, które umieszczano w plastikowych naczynkach z nylonową siatką zamiast dna. Naczynka umieszczano w studzienkach inkubacyjnych zawierających 1,5 ml buforu Krebsa z dodatkiem BSA (albumina bydlęca) w temperaturze  $39-40^{\circ}\text{C}$ , pozwalając na stabilizację wydzielania. Po okresie stabilizacji przystępowano do właściwej inkubacji, przekładając naczynka z tkankami do kolejnych studzienek wg schematu: A – 10 min Krebs (stabilizacja, określenie wydzielania podstawowego), B – 10 min Krebs, C – 10 min Krebs z dodatkiem *in vitro* greliny, D – 10 min Krebs, E – 10 min Krebs, F – 10 min Krebs z dodatkiem *in vitro* naltreksonu, G – 10 min Krebs i H – 10 min Krebs.

Po zakończeniu inkubacji ze wszystkich studzienek pobierano 1 ml medium inkubacyjnego i do momentu oznaczania ilości wydzielonej greliny zamrażano je, i przechowywano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Oznaczanie poziomu wydzielonej greliny w medium inkubacyjnym oraz stężenia greliny w tkankach przeprowadzono metodą radioimmunologiczną za pomocą zestawów Ghrelin (Total) firmy LINCO Research (USA), gdzie jako znacznik wykorzystano  $^{125}\text{I}$  oraz swoiste przeciwciała dla greliny. Do oznaczania pobierano 100  $\mu\text{l}$  nadsącza z homogenatu tkanki lub 200  $\mu\text{l}$  liofilizatów z medium inkubacyjnego rozpuszczonych w buforze. W drugim dniu badania do wszystkich próbek dodawano znakowaną  $^{125}\text{I}$  grelinę, po czym inkubowano je



**Ryc. 1.** Stężenie greliny w wątrobie i błonie śluzowej żołądka w przeliczeniu na 1 mg białka

**Fig. 1.** Hepatic and gastric mucosal ghrelin concentration per 1 mg protein

przez 24 godz. w temperaturze 4°C. W trzecim dniu dodawano odczynnik do precypitacji i inkubowano 20 min w temperaturze 4°C. Próbkę wirowano przy 2000–3000 × g w temperaturze 4°C przez 20 min. Następnie próbki de-

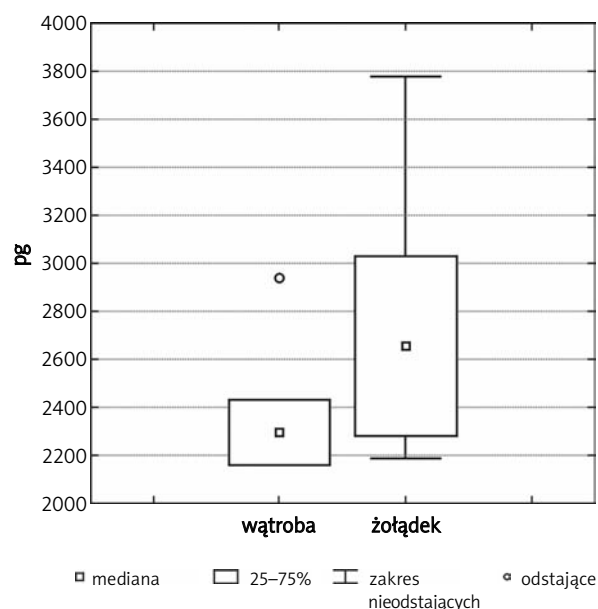
kantowano, a radioaktywność mierzono w liczniku promieniowania  $\gamma$ . Poziom greliny w badanych próbkach określano w oparciu o krzywą standardową. Standard greliny był wyznaczany przez korelację różnych stężeń tego związku i jego radioaktywność. Wyniki stężenia greliny w wątrobie i żołądka przedstawiono w pikogramach w przeliczeniu na 1 mg białka tkanki.

Analizę statystyczną stężeń greliny w miększu wątroby i śluzówce żołądka oraz w nadsączu w następstwie wydzielania podstawowego i stymulowanego naltreksonem w związku z rozkładem odbiegającym od normalnego przeprowadzono w oparciu o test nieparametryczny U Manna-Whitneya, a w przypadku stymulacji greliną przy rozkładzie normalnym w oparciu o test t-Studenta. Jako istotne statystycznie przyjęto wartości  $p < 0,05$ .

## Wyniki

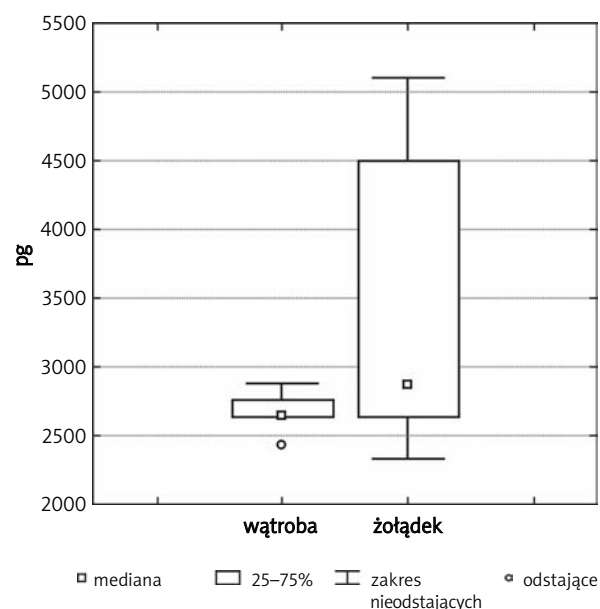
Statystycznie istotna różnica ( $p = 0,006$ ) stwierdzona została pomiędzy rozkładem wartości stężenia greliny w śluzówce żołądka oraz wątroby, z medianą 100 pg w żołądku i 5 pg w wątrobie w przeliczeniu na 1 mg białka w próbce (ryc. 1).

Wydzielanie podstawowe oraz stymulowane greliny nie wykazało statystycznie istotnego zróżnicowania w materiale tkankowym wątroby i żołądka (ryc. 2–4.).



**Ryc. 2.** Wydzielanie greliny w warunkach podstawowych w wątrobie i błonie śluzowej żołądka

**Fig. 2.** Hepatic and gastric mucosal ghrelin secretion in stabilized conditions



**Ryc. 3.** Wydzielanie greliny w warunkach stymulacji greliną w wątrobie i błonie śluzowej żołądka

**Fig. 3.** Hepatic and gastric mucosal ghrelin secretion after ghrelin stimulation

## Omówienie

Komórki błony śluzowej dna i trzonu żołądka są źródłem ok. 65% krążącej greliny, która drogą endokrynną przez modulowanie ośrodków podwzgórzowych kształtuje zachowania zwiększające przyjmowanie pokarmów [13]. Do czynników hamujących syntezę tego hormonu należą glukoza lub tłuszcze wprowadzane drogą pokarmową bądź parenteralną [14]. Uwalnianie greliny jest zróżnicowane w zakresie płci; w modelu zwierzęcym u samic cechuje się względnie stałym poziomem wydzielania, u samców ma charakter pulsacyjny [15].

Rola greliny w fizjologii żołądka łączy się ze stymulacją motoryki i opróżniania tego narządu, a także zwiększaniem wydzielania kwasu żołądkowego [16, 17]. Równocześnie stwierdzany jest silny gastrotekcyjny efekt, zapobiegający występowaniu uszkodzeń indukowanych etanolem, prawdopodobnie w mechanizmie zależnym od uwalniania tlenu azotu [18].

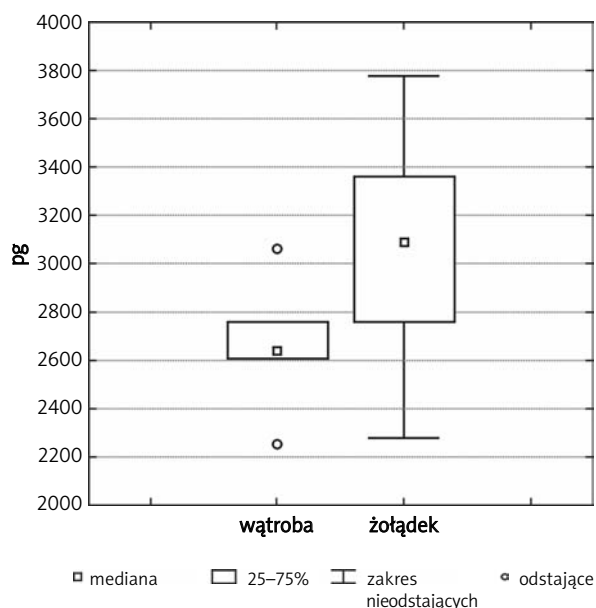
Niewiele wiadomo o efektach metabolicznych działania greliny w następstwie stymulacji receptorów obwodowych GHS-R. W wątrobie grelina indukuje ekspresję genów odpowiadających za stymulację lipogenezy i glukogenezy, z redukcją utleniania kwasów tłuszczowych i zwiększeniem zawartości trójglicerydów [19]. Szeroka dystrybucja badanego związku w tkankach obwodowych wskazuje na jego istotną biologiczną funkcję. Źródła wątrobowej greliny pozostają nieznane. Jej obecność może łączyć się z regulacją przedstawionych powyżej procesów metabolicznych, degradacją greliny pochodzącej z osocza krwi. W przypadku analizowanego materiału dotyczącego chorych z przewlekłym zapaleniem, grelina może pochodzić z komórek immunologicznych nacieku zapalnego [20].

Dwudziestokrotnie większe stężenie greliny w śluzówce żołądka w stosunku do mięszu wątroby wskazuje na dominującą rolę żołądka jako głównego źródła tego hormonu (ryc. 1). Otrzymane wyniki potwierdzają obecność greliny w mięszu wątroby, z wydzielaniem *in vitro* spoczynkowym i w następstwie stymulacji czynnikami potencjalnie pobudzającymi lub hamującymi, niższymi, ale statystycznie nieistotnymi w stosunku do śluzówki dna i trzonu żołądka (ryc. 2–4).

Wyniki niniejszej pracy stanowią podstawę do dalszych badań, umożliwiających poznanie i przeciwdziałanie zaburzeniom metabolicznym oraz niedoborom żywieniowym rozwijającym się w chorobach wątroby.

## Wnioski

Tkanka wątrobowa wykazuje 20-krotnie niższe stężenie greliny niż tkanki żołądka. Wydzielanie podstawowe greliny oraz w następstwie stymulacji czynnikami potencjalnie hamującymi lub pobudzającymi jest zbliżone w obu badanych tkankach.



**Ryc. 4.** Wydzielanie greliny w warunkach stymulacji naltreksonem w wątrobie i błonie śluzowej żołądka

**Fig. 4.** Hepatic and gastric mucosal ghrelin secretion after naltrexone stimulation

## Piśmiennictwo

1. Tomasetto C, Wendling C, Rio MC i wsp. Identification of cDNA encoding motilin related peptide/ghrelin precursor from dog fundus. *Peptides* 2001; 22: 2055-9.
2. De Vriese C, Gregoire F, Lema-Kisoka R i wsp. Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: identification of the cleavage sites. *Endocrinology* 2004; 145: 4997-5005.
3. Wu R, Zhou M, Cui X i wsp. Ghrelin clearance is reduced at the late stage of polymicrobial sepsis. *Int J Mol Med* 2003; 12: 777-81.
4. Tacke F, Brabant G, Kruck E i wsp. Ghrelin in chronic liver disease. *J Hepatol* 2003; 38: 447-54.
5. Breidert M, Zimmermann TF, Schneider R i wsp. Ghrelin/Leptin-imbalance in patients with primary biliary cirrhosis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2004; 112: 123-6.
6. Meier U, Gressner AM. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem* 2004; 50: 1511-25.
7. Marchesini G, Bianchi G, Lucidi P i wsp. Plasma ghrelin concentrations, food intake, and anorexia in liver failure. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2136-41.
8. Nieminen P, Mustonen AM. Effects of peripheral ghrelin on the carbohydrate and lipid metabolism of the tundra vole (*Microtus oeconomus*). *Gen Comp Endocrinol* 2004; 138: 182-7.
9. Mustonen AM, Nieminen P, Hyvarinen H. Leptin, ghrelin, and energy metabolism of the spawning burbot (*Lota lota*, L.). *J Exp Zool* 2002; 293: 119-26.

10. Marchesini G, Pagotto U, Bugianesi E i wsp. Low ghrelin concentrations in nonalcoholic fatty liver disease are related to insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 5674-9.
11. Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA i wsp. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2988.
12. Kowalski C, Giraud P. Dopamine decreased striatal enkephalin turnover and proenkephalin messenger RNA abundance via D2 receptor activation in primary striatal cell cultures. *Neuroscience* 1993; 53: 665-72.
13. Dockray GJ. *Gastrointestinal Hormones: Gastrin, Cholecystokinin, Somatostatin, and Ghrelin*. W: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Johnson LR, Barrett KE, Ghishan FK i wsp. (red.). Elsevier Academic Press. USA 2006; 91-120.
14. Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M i wsp. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 240-4.
15. Liu YL, Yakar S, Otero-Corchon V i wsp. Ghrelin gene expression is age-dependent and influenced by gender and the level of circulating IGF-1. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 189: 97-103.
16. Masuda Y, Tanaka T, Inomata N i wsp. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276: 905-8.
17. Sibilio V, Pagani F, Guidobono F i wsp. Evidence for a central inhibitory role of growth hormone secretagogues and ghrelin on gastric acid secretion in conscious rats. *Neuroendocrinology* 2002; 75: 92-97.
18. Sibilio V, Rindi G, Pagani F i wsp. Ghrelin protects against ethanol-induced gastric ulcers in rats: studies on mechanisms of action. *Endocrinology* 2003; 144: 353-9.
19. Barazzoni R, Bosutti A, Stebel M i wsp. Ghrelin regulates mitochondrial-lipid metabolism gene expression and tissue fat distribution in liver and skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288: E228-35.
20. Hattori N, Saito T, Yagyu T i wsp. GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4284-91.